

## 含对硝基苯丙氨酸 HER2 疫苗的免疫原性研究

何羽, 田洪, 戴鑫, 姚文兵, 高向东\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 为了打破 HER2 自身蛋白的免疫耐受, 产生高效的免疫应答, 利用遗传密码扩充技术, 将免疫原性氨基酸对硝基苯丙氨酸定点引入到 HER2 片段的第 5、26、79 位, 获得了含有对硝基苯丙氨酸的 HER2 突变体。通过镍亲和色谱柱, 获得纯度达 95% 以上的原型和突变体 HER2 分子。对 HER2 疫苗的免疫原性进行分析, 结果显示, pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup> HER2 能够在 C57BL/6 小鼠体内产生高滴度的交叉性抗体。免疫小鼠的抗血清能够识别具有完整 HER2 受体胞外区的 SKBR-3 细胞, 并通过 ADCC 效应裂解 HER2 高表达的 HER2 + B16F10 细胞。这些研究结果提示, 定点引入了对硝基苯丙氨酸的 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup> HER2 可以作为靶向 HER2 的肿瘤疫苗候选分子。

**关键词** HER2; 对硝基苯丙氨酸; 免疫原性

**中图分类号** R967 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2018)03–0369–07

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20180317

**引用本文** 何羽, 田洪, 戴鑫, 等. 含对硝基苯丙氨酸 HER2 疫苗的免疫原性研究[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(3): 369–375.

**Cite this article as:** HE Yu, TIAN Hong, DAI Xin, et al. Immunogenicity of HER2 vaccine containing *p*-nitrophenylalanine[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(3): 369–375.

## Immunogenicity of HER2 vaccine containing *p*-nitrophenylalanine

HE Yu, TIAN Hong, DAI Xin, YAO Wenbing, GAO Xiangdong\*

*Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*

**Abstract** In order to delete the immune tolerance of self-protein HER2 and produce an efficient immune response, the genetic code expansion technique was employed to introduce the immunogenic amino acid *p*-nitrophenylalanine into the position 5, 26 and 79 of the HER2 fragment and HER2 mutants containing *p*-nitrophenylalanine were obtained. Prototype and mutant HER2 molecules with a purity of more than 95% were obtained through a nickel affinity column. Immunogenicity analysis of the HER2 vaccine showed that pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup> HER2 was able to produce high titer cross-reactive antibodies in C57BL/6 mice and that the mouse antisera could recognize SKBR-3 cells with intact HER2 receptor extracellular domain and cleave HER2 highly expressed HER2 + B16F10 cells through ADCC effect. These findings suggested that pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup> HER2 which incorporates *p*-nitrophenylalanine could be used as a tumor vaccine candidate targeting HER2.

**Key words** HER2; *p*-nitrophenylalanine; immunogenicity

This study was supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 81673343, No. 81573335, No. 91753112)

人表皮生长因子受体 2 (HER2) 是一个 185 kD 的跨膜受体, 具有酪氨酸激酶活性。HER2 受体通过与其他受体结合, 激活具有酪氨酸激酶功能的胞内区, 诱导信号通路活化, 促进细胞增殖<sup>[1]</sup>。目前

已在多种肿瘤中发现了 HER2 受体的过表达, 其中约有 20% ~ 30% 的乳腺癌患者是 HER2 高表达<sup>[2]</sup>。HER2 高表达的肿瘤患者具有生存时间短、预后较差、容易复发转移等特点, 因此 HER2 是一

收稿日期 2018-03-28 \*通信作者 Tel: 025–83271543 E-mail: xdgao@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81673343, No. 81573335, No. 91753112)

个理想的抗肿瘤靶点。

目前,以 HER2 为靶点的相关药物主要包括单克隆抗体曲妥珠单抗和小分子抑制剂拉帕替尼<sup>[3-4]</sup>。但是这两类药物均存在一定的耐药性以及细胞毒性<sup>[5-7]</sup>。与被动免疫应答相比,主动免疫应答可以产生多克隆抗体,解决单克隆抗体的耐药性问题,并且可以产生免疫记忆效应,防止肿瘤细胞的转移与复发<sup>[8]</sup>。因此,HER2 肿瘤疫苗是一种有潜力的治疗药物。目前已有多种以 HER2 为靶点的 DNA、多肽、蛋白疫苗进入临床研究,然而大部分 HER2 肿瘤疫苗终止于临床 II 期研究,原因是 HER2 是自身蛋白,免疫原性低,难以诱导机体产生有效的免疫应答<sup>[9-10]</sup>。因此,如何提高 HER2 肿瘤抗原的免疫原性,打破机体免疫耐受是 HER2 肿瘤疫苗设计开发的关键。

近年来研究发现,利用遗传密码扩充技术,在蛋白质上连接具有免疫原性的非天然氨基酸可以有效打破自身蛋白的免疫耐受,产生有效的免疫应答<sup>[11]</sup>。研究表明,将对硝基苯丙氨酸(pNO<sub>2</sub>Phe)引入到 B 淋巴细胞刺激因子(BAFF)和小鼠补体因子 C5a 中,能诱导机体产生与内源性 BAFF 和 C5a 蛋白发生交叉反应的 IgG 抗体<sup>[12-14]</sup>。

本研究采用 HER2 胞外 23~146 片段作为原型分子 Wt HER2,利用遗传密码扩充技术在其 5、26、79 位上定点引入 pNO<sub>2</sub>Phe 获得改构体(pNO<sub>2</sub>Phe<sup>5</sup>HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>26</sup>HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2),通过检测抗体滴度筛选出免疫原性最高的 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 作为疫苗候选分子,对 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 疫苗诱导产生的抗体进行分析,证明了 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 诱导产生的抗体能够识别完整 HER2 的胞外区序列,并可以通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)裂解 HER2 + B16F10 肿瘤细胞,提示 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 可以作为靶向 HER2 的肿瘤疫苗候选分子。

## 1 材料

### 1.1 菌种和质粒

*E. coli* BL21(DE3)、pET28a(+) Vector 均为中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室保存。

### 1.2 试剂

Prime STAR DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限

制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III、*Bsp*HI(大连 TaKaRa 公司);pNO<sub>2</sub>Phe(上海吉尔生化有限公司);HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中山金桥生物科技有限公司);3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,北京索莱宝科技有限公司);FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(美国 Sigma 公司);小鼠脾脏淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);BCA 试剂盒、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

### 1.3 动物

清洁级 C57BL/6 雌性小鼠(6~8 周龄)购自扬州大学比较医学中心,合格证号:SCXK(苏)2017-0007。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

### 1.4 细胞株

人乳腺癌细胞株 SKBR-3(上海斯信生物科技有限公司);HER2 高表达的小鼠黑色素瘤细胞株 HER2 + B16F10(中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室保存)。

## 2 方法

### 2.1 Wt HER2 基因的克隆

根据 HER2(GenBank 登录号:M11730.1)序列,选择胞外 23~146 序列片段,运用 DNAWORK 在线软件,参考大肠埃希菌的密码子偏爱性,设计 10 条引物(见表 1)。

用 Prime STAR DNA 聚合酶进行 overlapping PCR,进行两轮 PCR 扩增。第一轮 PCR 以 P2~P9 为引物,PCR 反应条件为:94℃,5 min;94℃,30 s,58℃,30 s,72℃,45 s,30 个循环;72℃延伸 8 min,回收并纯化 PCR 产物 I。第二轮 PCR 以 P1、P10 为引物,以 PCR 产物 I 为模板,PCR 反应条件为:94℃,5 min;94℃,30 s,58℃,30 s,72℃,45 s,30 个循环;72℃延伸 8 min,回收并纯化 PCR 产物 II。

### 2.2 突变体 HER2 基因的克隆

在 Wt HER2 抗原片段 DNA 序列的基础上,将第 5 位 Thr 密码子 ACC、第 26 位 His 密码子 CAT 和第 79 位 Ile 密码子 ATT 分别置换为琥珀密码子 TAG,利用 DNAWORK 在线软件对突变体 HER2 进行引物设计(见表 2)。

**Table 1** Primer sequences of Wt HER2 designed by DNAWORK software

Primer	Sequences(5'→3')
P1	ATCATGACCCAGGTGTGCACCGGC
P2	AGATGGGTTTCCGGTGACGCCGGCAGACGTAACCTCAT- ATCGGTGCCGGTGACACACT
P3	TCACCGGAAACCCATCTGGATATGCTGCGTCATCTGTA- TCAGGGCTGCCAAGTGCTGC
P4	AAGCTCGCATTGGTCGGCAGATACGTCAGTTCAGATT- GCCCTGCACCACTTGGCAGC
P5	CGACCAATGCCAGCTTGAGCTTTTTCAGGATATTTCAG- GAAGTGCAAGGCTATGTGCT
P6	AGCGCTGTAACGGCACCTGACGCACCTTGATTGTGTGCA- ATCAGCACATAGCCTTGAC
P7	TGCCGTTACAGCGCTTGCGTATTGTGCGTGGCACCCAG- CTGTTTGAAGATAACTATGC
P8	ATTATTACGGGATCGCCATTATCCAGCACCGCCACGG- CATAGTTATCTTCAAACAGC
P9	GGCGATCCGCTGAATAATACCAACCCCTGTGACCGGCG- CTAGTCCAGCGCGCTGCGTG
P10	AAGCTTAGTGCTGCTGCTGCTGCTGCGTCAAGGCTACG- CAGTTGCAGTTCACGCAGGCCGCC

**Table 2** Primer sequences of mutated HER2 designed by DNAWORK software

Primer	Sequences(5'→3')
P1'	ATCATGACCCAGGTGTGCTAGGGC
P3'	TCACCGGAAACCCATCTGGATATGCTGCGTTAGCTGTA- TCAGGGCTGCCAAGTGCTGC
P7'	TGCCGTTACAGCGCTTGCGTTAGGTGCGTGGCACCCAG- CTGTTTGAAGATAACTATGC

对突变体 HER2 基因进行克隆,PCR 扩增条件同“2.1”项。所得到的 DNA 序列即为突变体 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>5</sup> HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>26</sup> HER2 和 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup> HER2 的 DNA 序列。

### 2.3 Wt HER2 表达菌株的构建

选择限制性内切酶 *Bsp*H I 和 *Hind* III 对 PCR 产物 II 进行双酶切,选择限制性内切酶 *Nco* I 和 *Hind* III 对表达载体 pET28a 进行双酶切,胶回收酶切产物,T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接。连接产物转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 大肠埃希菌感受态细胞,并涂布在含卡那霉素 (Kan) 抗性的 LB 平板培养基上,37 °C 培养箱内过夜培养。次日挑取阳性单克隆,接种在含 Kan 抗性的液体 LB 培养基中,37 °C,220 r/min 过夜培养。测序。

### 2.4 HER2 突变体表达菌株的构建

同“2.3”项对突变体进行构建。将测序正确的质粒 pET28a-5TAG-HER2, pET28a-26TAG-HER2 和 pET28a-79TAG-HER2 质粒分别与识别 pNO<sub>2</sub>Phe

的 tRNA 和氨酰 tRNA 合成酶的质粒 pAC-4tRNA-pNO<sub>2</sub>PheRS 共转化 *E. coli* BL21 (DE3) 大肠埃希菌感受态细胞,并涂布在含 Kan 和氯霉素 (Cm) 抗性的 LB 平板培养基上,37 °C 培养箱内过夜培养。次日挑取阳性单克隆,接种在含 Kan 和 Cm 抗性的液体 LB 培养基中,37 °C,220 r/min 过夜培养。测序。

### 2.5 Wt HER2 的表达纯化

将测序正确的 Wt HER2 菌 200 μL 接种于含 Kan 抗性的 LB 培养基 20 mL 中,37 °C 过夜培养。按照 1:100 的体积比将过夜菌加入到含 Kan 抗性的 LB 培养基中,37 °C,220 r/min 进行培养 3 h 后 ( $A_{600}=0.6$ ),加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,37 °C,220 r/min 培养 5 h 后,8 000 r/min 离心 5 min,收集菌体。超声破碎菌体,离心取沉淀,对包涵体进行清洗以去除杂蛋白和核酸等杂质。用 8 mol/L 尿素对包涵体进行变性,4 °C 过夜搅拌,变性液过 Ni 亲和色谱柱,500 mmol/L 的咪唑缓冲液洗脱目的蛋白,然后按体积比 1:4 加入 pH 9.0 的复性缓冲液,用 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液透析,超滤浓缩,BCA 法测蛋白浓度。

### 2.6 突变体 HER2 的表达纯化

将 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>5</sup>HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>26</sup>HER2 和 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 菌 200 μL 分别接种于含 Kan 和 Cm 抗性的 LB 培养基 20 mL 中,37 °C 过夜培养。按照 1:100 的体积比将过夜菌加入到含 Kan 和 Cm 抗性的液体 M9 培养基中,37 °C,220 r/min 进行培养 7.5 h 后,加入终浓度为 0.1 mol/L 的对硝基苯丙氨酸,培养 0.5 h 后,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,37 °C,220 r/min 培养 18 h 后,8 000 r/min 离心 5 min,收集菌体。同“2.5”项对突变型 HER2 进行纯化。BCA 法测蛋白浓度。

### 2.7 ELISA 法检测小鼠血清中抗 Wt HER2 抗体滴度

将 6~8 周雌性 C57BL/6 小鼠分成 PBS、Wt HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>5</sup>HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>26</sup>HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 组。皮下免疫小鼠,每次每只给药 20 μg,每周免疫 1 次,共免疫 2 周,最后一次免疫 1 周后,眼眶取血分离血清。ELISA 法检测小鼠抗血清中针对 Wt HER2 的抗血清滴度。在酶标条中每孔加入终浓度为 5 μg/mL 的 HER2 蛋白 100 μL,37 °C 孵育 2 h;PBST 清洗 5 次;然后每孔加入 5% BSA 封闭液 200 μL,4 °C 孵育过夜;PBST 清洗 5 次;每孔加入稀释后的小鼠血清 100 μL;37 °C 孵育 2 h;

PBST 清洗6次;每孔加入稀释后的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 100  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 孵育 45 min; PBST 清洗6次;每孔加入 TMB 底物反应液 100  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min; 每孔加入 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  50  $\mu$ L 终止反应;检测  $A_{450}$  处孔内样品的吸收度。

## 2.8 流式细胞法检测小鼠抗血清识别 SKBR-3 能力

将 6~8 周雌性 C57BL/6 小鼠分成 PBS、Wt HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup> HER2 组, 免疫过程及取血同“2.7”项。取稀释后的血清 200  $\mu$ L 与  $1 \times 10^6$  个 SKBR-3 细胞混合, 4  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。设置空白对照组: 不含抗血清的 PBS 与 SKBR-3 细胞孵育。PBS 清洗3次。将稀释后的 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 与清洗后的 SKBR-3 细胞进行孵育, 4  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 清洗3次。用 PBS 缓冲液 200  $\mu$ L 对细胞进行重悬, 运用流式细胞仪检测细胞表面的平均荧光强度。

## 2.9 乳酸脱氢酶释放法检测小鼠抗血清介导的 ADCC 效应

小鼠分组、免疫同“2.8”项。最后一次免疫 1 周后, 处死小鼠, 利用小鼠脾脏淋巴细胞分离液分离淋巴细胞作为效应细胞, HER2 + B16F10 作为靶细胞。

固定靶细胞每孔  $5 \times 10^3$  个, 按照不同的效应细胞与靶细胞比 (E: T = 50: 1, 25: 1, 12.5: 1) 加入淋巴细胞, 并在每孔加入小鼠血清 4  $\mu$ L。并设置空白组: 淋巴细胞 + 小鼠抗血清, 对照组: 淋巴细胞 + HER2 + B16F10 细胞。所有样品孔内都是 200  $\mu$ L 体系。将样品置于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 4 h 后。按照乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒说明书对样品进行检测。通过检测乳酸脱氢酶的释放, 比较不同浓度的效应细胞与靶细胞比例下靶细胞裂解程度。

将靶细胞固定每孔  $5 \times 10^3$  个, 固定效应细胞与靶细胞比 (E: T = 50: 1), 加入效应细胞, 小鼠血清抗体稀释 50、200、800 倍。并设置空白组: 淋巴细胞 + 小鼠抗血清, 对照组: 淋巴细胞 + HER2 + B16F10 细胞。所有样品孔内都是 200  $\mu$ L 体系。将样品置于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 4 h 后。按照乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒说明书对样品进行检测。检测乳酸脱氢酶的释放, 比较不同抗体稀释度下靶细胞裂解程度。

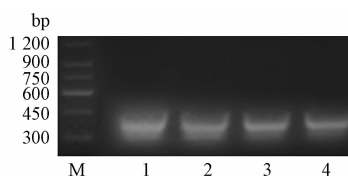
## 2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析。采用 Student's *t*-test 进行数据显著性比较,  $P < 0.05$  为显著性差异, 具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 Wt HER2 及突变体的构建

根据 GenBank (登录号: M11730.1) 获得目的基因片段 Wt HER2, 同时第 5、26、79 位分别突变成 TAG 获得 pET28a-5TAG-HER2, pET28a-26TAG-HER2 和 pET28a-79TAG-HER2, 利用在线网站 DNAWORK 设计 10 条长引物, 两轮 overlapping PCR 后结果如图 1 所示。在 403 bp 出现与理论大小相当的目的基因。



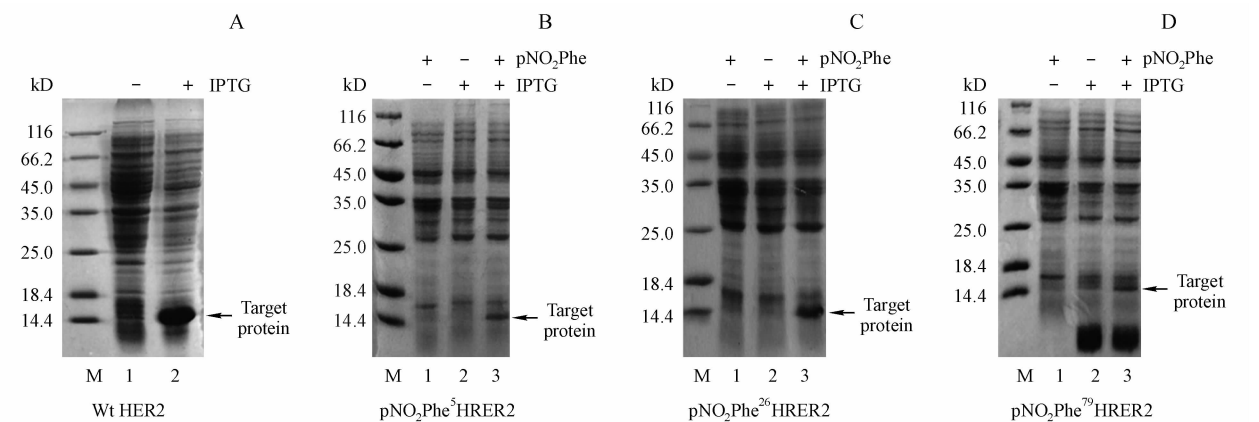
**Figure 1** Agarose electrophoresis analysis of overlapping PCR products M: Marker; 1: Wt HER2; 2: pNO<sub>2</sub>Phe<sup>5</sup> HER2; 3: pNO<sub>2</sub>Phe<sup>26</sup> HER2; 4: pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup> HER2

### 3.2 Wt HER2 及突变体的表达

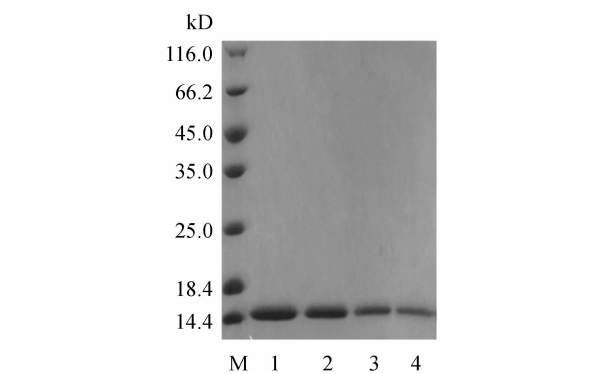
对 Wt HER2 菌株进行表达, 取 IPTG 诱导前后全菌进行电泳, 如图 2-A 所示。相比于诱导前的菌体, IPTG 诱导后在 14.7 kD 附近出现了条带, 与目的蛋白相对分子质量大小相符。对突变体 HER2 菌株进行表达, SDS-PAGE 鉴定目的蛋白的表达, 结果如图 2-B~D 所示。未加 IPTG 而加 pNO<sub>2</sub>Phe 时在 14.7 kD 处没有目的蛋白的表达, 加 IPTG 而未加 pNO<sub>2</sub>Phe 时在 14.7 kD 处也没有目的蛋白的表达, 而同时加入 IPTG 和 pNO<sub>2</sub>Phe 时在 14.7 kD 处有明显目的蛋白的表达, 证明非天然氨基酸成功定点引入到突变位点。

### 3.3 Wt HER2 及突变体的纯化

对 Wt HER2 及突变体进行纯化, 将最终目的蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定, 结果如图 3。通过 Gel-pro analyzer 软件分析, 本研究得到了电泳纯大于 95% 的 Wt HER2 及突变体蛋白, 并通过 MOLDI-TOF 检测 pNO<sub>2</sub>Phe 所在肽段的相对分子质量 (图略), 结果如表 3 所示。检测的结果与理论相对分子质量结果一致, 证明 pNO<sub>2</sub>Phe 的成功定点引入到 Wt HER2。



**Figure 2** SDS-PAGE analysis of the expression Wt HER2 and mutated HER2  
A: Wt HER2. M: Marker, 1: Before IPTG induction, 2: After IPTG induction; B-D: mutated HER2. M: Marker, 1: Before IPTG induction and after pNO<sub>2</sub>Phe addition, 2: After IPTG induction and before pNO<sub>2</sub>Phe addition, 3: After IPTG induction and pNO<sub>2</sub>Phe addition

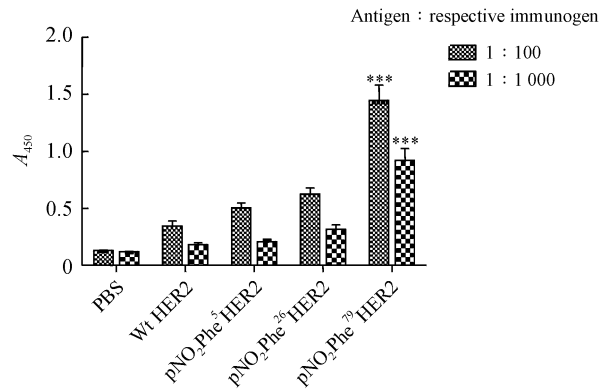


**Figure 3** SDS-PAGE analysis of the purified Wt HER2 and mutated HER2  
M: Marker; 1: Wt HER2; 2: pNO<sub>2</sub>Phe<sup>5</sup>HER2; 3: pNO<sub>2</sub>Phe<sup>26</sup>HER2; 4: pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2

3.4 Wt HER2 突变体的免疫原性

将 PBS、Wt HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>5</sup>HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>26</sup>HER2、pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 免疫小鼠,第 3 周免疫效果如图 4 所示。小鼠体内产生了能够识别 Wt HER2 的抗体。与 Wt HER2 免疫组相比,pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 组产生了最高的抗 Wt HER2 片段的抗体滴度,且在血清稀释 100 倍和 1 000 倍的情况下,pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>

HER2 组与 Wt HER2 组都存在显著性差异 ( $P < 0.001$ )。但 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>5</sup>HER2 组和 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>26</sup>HER2 组与 Wt HER2 组相比差异不显著。上述结果提示,在 C57BL/6 小鼠体内,pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 具有较强的免疫原性,后续选择 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 做进一步研究。



**Figure 4** Immunogenicity of Wt HER2, pNO<sub>2</sub>Phe<sup>5</sup>HER2, pNO<sub>2</sub>Phe<sup>26</sup>HER2, pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
ELISA with Wt HER2 fragment as antigen  
\*\*\*  $P < 0.001$  vs Wt HER2 group

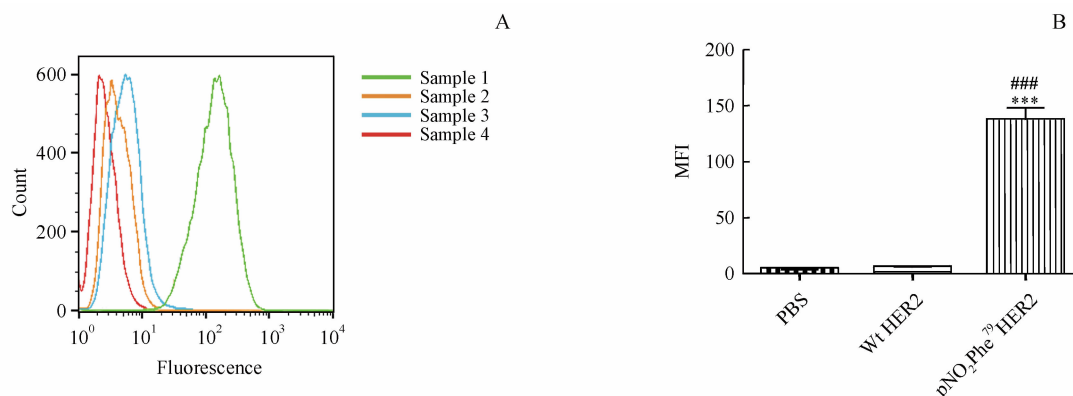
**Table 3** MALDI-TOF analysis of the peptides containing mutation sites from the mutated proteins digested by trypsin

Protein	Peptide	$M_r$ (observed)	$M_r$ (calculated)
pNO <sub>2</sub> Phe <sup>5</sup> HER2	TQVCpNO <sub>2</sub> PheGTDMK	1 174. 61	1 174. 46
pNO <sub>2</sub> Phe <sup>26</sup> HER2	MLRpNO <sub>2</sub> PheLYQGCQVVGQGNLE	2 042. 95	2 042. 92
pNO <sub>2</sub> Phe <sup>79</sup> HER2	pNO <sub>2</sub> PheVR	466. 26	466. 19

3.5 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 免疫小鼠的抗体特异性

为了探究 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 免疫小鼠产生的抗体是否能够与 HER2 过表达的肿瘤细胞结合,本研究通过流式细胞术检测 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 免疫抗血清能否识别 HER2 高表达的 SKBR-3 细胞,结果如

图 5 所示。pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 组细胞表面的平均荧光强度与 Wt HER2 抗原片段组相比存在显著性差异 ( $P < 0.001$ ),证明 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 突变体免疫小鼠产生的抗血清能有效识别细胞膜上完整 HER2 受体。



**Figure 5** Analysis of antisera binding to SKBR-3 by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

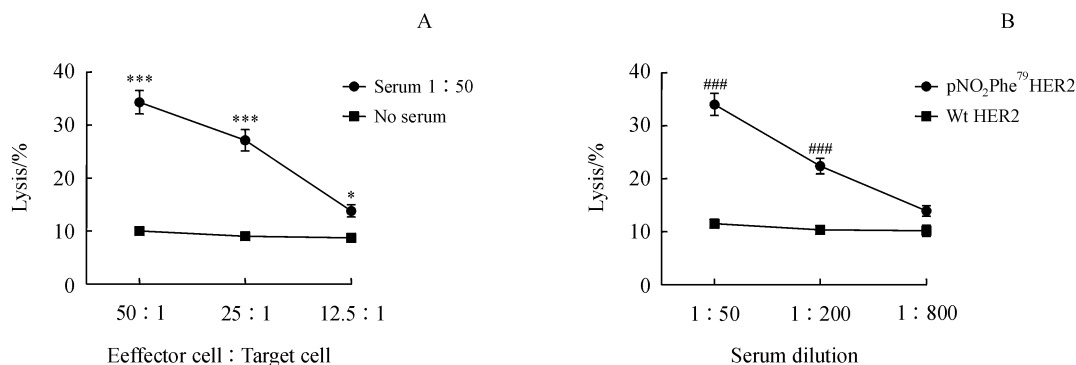
A: Visual comparison of flow cytometry results. Sample 1: Antisera from mice immunized with pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2, Sample 2: Antisera from mice immunized with PBS, Sample 3: Antisera from mice immunized with Wt HER2, Sample 4: PBS; B: Statistics of mean fluorescence intensity (MFI)

\*\*\*  $P < 0.001$  vs PBS group; ###  $P < 0.001$  vs Wt HER2 group

### 3.6 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 免疫小鼠的药效分析

为了检测 pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 肿瘤疫苗免疫小鼠血清能否通过 ADCC 效应裂解 HER2 阳性肿瘤细胞,本研究以实验室前期构建的 HER2 高表达细胞株 HER2 + B16F10 为靶细胞,以小鼠淋巴细胞为效应细胞,通过检测乳酸脱氢酶的释放判断靶细胞的裂解程度。结果如图 6 所示,当固定血清稀释浓

度为 50:1 时,随着效应细胞与靶细胞比例的降低,裂解肿瘤细胞能力下降。但与未加血清相比, pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 免疫的小鼠血清能够显著增加肿瘤细胞的裂解能力。当固定 E:T = 50:1,随着血清稀释浓度的降低,裂解肿瘤细胞能力下降,但与 Wt HER2 组相比, pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2 组能够产生具有显著性差异的靶细胞裂解率。



**Figure 6** ADCC effect mediated by sera from pNO<sub>2</sub>Phe<sup>79</sup>HER2-immunized mice in different ratio of effector cells to target cells (A) and sera from different vaccine-immunized mice in different dilution (B) ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

\*\*\*  $P < 0.001$  vs No serum group; ###  $P < 0.001$  vs Wt HER2 group

## 4 讨论

对硝基苯丙氨酸是一种免疫原性氨基酸,能有效打破自身蛋白免疫耐受,诱导机体产生高滴度抗体。但有研究显示免疫原性氨基酸的引入受到位点限制<sup>[15]</sup>。因此,本实验选择了暴露在蛋白表面且不影响蛋白结构的 3 个氨基酸作为突变位点。突变位点选择的依据:(1)突变位点应尽量暴露在抗原分子表面,这样有利于非天然氨基酸的充分暴

露,且不影响蛋白空间构象;(2)具有明显毒性的抗原分子,所选突变位点应为其活性相关位点,突变后使其失活并仅具有免疫原性,这样可避免疫苗在免疫过程中对机体造成伤害。通过遗传密码扩充技术在 HER2 胞外区第 5、26、79 位定点引入非天然氨基酸,通过对包涵体蛋白的纯化,本研究成功获得了纯度大于 95% 的 Wt HER2 抗原片段及其突变体。利用 MOLDI-TOF 检测突变体胰酶酶解后 pNO<sub>2</sub>Phe 所在的肽段相对分子质量,证明了本研究将 pNO<sub>2</sub>Phe 成功定点引入至突变位点。接着

本研究通过检测 C57BL/6 小鼠体内产生的抗体滴度判断 Wt HER2 及突变体的免疫原性,结果表明  $\text{pNO}_2\text{Phe}^{79}\text{HER2}$  能针对 Wt HER2 产生最高滴度的抗体。因此本研究选择产生抗体滴度最高的  $\text{pNO}_2\text{Phe}^{79}\text{HER2}$  做进一步研究。有研究报道显示,将 HER2 胞外区 1~146 位氨基酸片段用胆固醇普鲁兰多糖包裹形成 CHP-HER2 疫苗,然而形成的 CHP-HER2 蛋白疫苗虽然能有效刺激机体产生针对 HER2 胞外 1~146 位氨基酸片段抗体,但是产生的抗体不能有效识别肿瘤细胞膜上的 HER2 受体<sup>[16]</sup>。本实验选用 23~146 位氨基酸残基作为原型抗原(1~22 位氨基酸残基为信号肽)。结果显示,与 CHP-HER2 相比, $\text{pNO}_2\text{Phe}^{79}\text{HER2}$  免疫小鼠产生的抗血清能够与肿瘤细胞膜上具有天然构象的 HER2 受体结合。在抗血清介导的 ADCC 效应实验中,当固定 E:T 为 50:1 时,HER2 + B16F10 细胞裂解比例随着小鼠血清浓度的稀释而下降,与之前的文献报道结果一致<sup>[17]</sup>。当固定血清稀释度为 50:1 时,HER2 + B16F10 细胞裂解比例随着淋巴细胞减少而下降。

综上所述,本文通过遗传密码扩充技术获得的  $\text{pNO}_2\text{Phe}^{79}\text{HER2}$  可以有效打破免疫耐受,产生能够识别 SKBR-3 细胞膜上天然构象的 HER2 受体,并通过 ADCC 效应裂解 HER2 高表达的细胞。因此,定点引入了  $\text{pNO}_2\text{Phe}$  的  $\text{pNO}_2\text{Phe}^{79}\text{HER2}$  可以作为治疗 HER2 过表达肿瘤的候选分子。

### 参考文献

- [1] Liu Y, el-Ashry D, Chen D, *et al.* MCF-7 breast cancer cells overexpressing transfected *cerbB-2* have an *in vitro* growth advantage in estrogen-depleted conditions and reduced estrogen-dependence and tamoxifen-sensitivity *in vivo* [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, **34**(2): 97–117.
- [2] Tsang R, Finn R. Beyond trastuzumab; novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2012, **106**(1): 6–13.
- [3] De Santes K, Slamon D, Anderson SK, *et al.* Radiolabeled antibody targeting of the HER-2/neu oncoprotein [J]. *Cancer Res*, 1992, **52**(7): 1916–1923.
- [4] Spector NL, Xia W, Burris H, *et al.* Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies [J]. *J Clin Oncol*, 2005, **23**(11): 2502–2512.
- [5] Earl HM, Vallier AL, Dunn J, *et al.* Trastuzumab-associated cardiac events in the Persephone trial [J]. *Br J Cancer*, 2016, **115**(12): 1462–1470.
- [6] Eryilmaz A, Demirci B, Gunel C, *et al.* Evaluation of lapatinib and trastuzumab for ototoxic effects [J]. *J Int Adv Otol*, 2015, **11**(3): 207–211.
- [7] Spector NL, Xia W, Burris H, *et al.* Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies [J]. *J Clin Oncol*, 2005, **23**(11): 2502–2512.
- [8] Costa RLB, Soliman H, Czerwiecki BJ. The clinical development of vaccines for HER2 + breast cancer: current landscape and future perspectives [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, **61**: 107–115.
- [9] Tabi Z, Man S. Challenges for cancer vaccine development [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, **58**(8): 902–915.
- [10] Dalglish AG. Therapeutic cancer vaccines: why so few randomised phase III studies reflect the initial optimism of phase II studies [J]. *Vaccine*, 2011, **29**(47): 8501–8505.
- [11] Grunewald J, Hunt GS, Dong L, *et al.* Mechanistic studies of the immunochemical termination of self-tolerance with unnatural amino acids [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(11): 4337–4342.
- [12] Dai HT, Tian H, Huang J, *et al.* Protective effects of *p*-nitrophenylalanine-containing BAFF vaccine on lupus nephritis model mice [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(4): 483–489.
- [13] Kessel C, Nandakumar KS, Peters FB, *et al.* A single functional group substitution in C5a breaks B cell and T cell tolerance and protects against experimental arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, **66**(3): 610–621.
- [14] Cai D, Tian H, Yao WB. Molecular dynamics simulation and analysis of BAFF which is incorporated with *p*-nitro-L-phenylalanine [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(2): 227–232.
- [15] Gauba V, Grunewald J, Gorney V, *et al.* Loss of CD4 T-cell-dependent tolerance to proteins with modified amino acids [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**(31): 12821–12826.
- [16] Kageyama S, Kitano S, Hirayama M, *et al.* Humoral immune responses in patients vaccinated with 1-146 HER2 protein complexed with cholesteryl pullulan nanogel [J]. *Cancer Sci*, 2008, **99**(3): 601–607.
- [17] Hardy LL, Wick DA, Webb JR. Conversion of tyrosine to the inflammation-associated analog 3'-nitrotyrosine at either TCR- or MHC-contact positions can profoundly affect recognition of the MHC class I-restricted epitope of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein 33 by CD8 T cells [J]. *J Immunol*, 2008, **180**(9): 5956–5962.